



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

<p>(51) Classification internationale des brevets ⁵ : C12P 21/08, G01N 33/577 C07K 15/00, C12P 21/00</p>	<p>A1</p>	<p>(11) Numéro de publication internationale: WO 92/09699 (43) Date de publication internationale: 11 juin 1992 (11.06.92)</p>
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/BE91/00083 (22) Date de dépôt international: 26 novembre 1991 (26.11.91) (30) Données relatives à la priorité: 9001128 27 novembre 1990 (27.11.90) BE (71) Déposant (<i>pour tous les Etats désignés sauf US</i>): L.F. WILL & CIE S.A. [BE/BE]; Rue Joseph Stallaert 2, B-1060 Bruxelles (BE). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (<i>US seulement</i>): OCTAVE, Jean-Noël [BE/BE]; Chaussée de Louvain 418, B-1328 Ohain (BE). MALOTEAUX, Jean-Marie [BE/BE]; Chaussée de Bruxelles 633, B-6310 Les-Bons-Villiers (BE).</p>		<p>(74) Mandataires: PLUCKER, Guy etc. ; Office Kirkpatrick Sprl., 4, square de Meeûs, B-1040 Bruxelles (BE). (81) Etats désignés: AT (brevet européen), AU, BE (brevet européen), CH (brevet européen), DE (brevet européen), DK (brevet européen), ES (brevet européen), FR (brevet européen), GB (brevet européen), GR (brevet européen), IT (brevet européen), JP, LU (brevet européen), NL (brevet européen), SE (brevet européen), US. Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i></p>
<p>(54) Title: MONOCLONAL ANTIBODY FOR USE IN DIAGNOSING ALZHEIMER'S DISEASE, HYBRIDOMA SECRETING SAID ANTIBODY AND PREPARATION METHOD THEREFOR (54) Titre: ANTICORPS MONOCLONAL UTILE POUR LE DIAGNOSTIC DE LA MALADIE D'ALZHEIMER, HYBRIDOME SECRETEUR D'UN TEL ANTICORPS MONOCLONAL ET PROCEDE POUR SA PREPARATION (57) Abstract <p>A monoclonal antibody directed against part of the extracellular domain of the APP precursor of peptide AβP is provided for recognising both kinds of lesions which are typical of Alzheimer's disease as well as the soluble form of the APP precursor. The use of this antibody for detecting said lesions and for assaying said soluble form of APP, as well as the hybridoma which produces said monoclonal antibody, a method for preparing said hybridoma, and a protein used as an antigen in said method, are also described.</p> (57) Abrégé <p>L'invention concerne un anticorps monoclonal dirigé contre une partie du domaine extracellulaire du précurseur APP du peptide AβP, cet anticorps étant capable de reconnaître les deux types de lésions caractéristiques de la maladie d'Alzheimer et la forme soluble du précurseur APP. L'invention concerne également l'utilisation de cet anticorps pour la détection des lésions caractéristiques de la maladie d'Alzheimer ainsi que pour le dosage de la forme soluble de l'APP. L'invention concerne aussi l'hybridome produisant cet anticorps monoclonal, le procédé de préparation de cet hybridome, ainsi que la protéine utilisée comme antigène dans ce procédé.</p> </p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	ES	Espagne	MG	Madagascar
AU	Australie	FI	Finlande	ML	Mali
BB	Barbade	FR	France	MN	Mongolie
BE	Belgique	GA	Gabon	MR	Mauritanie
BF	Burkina Faso	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
BG	Bulgarie	GN	Guinée	NL	Pays-Bas
BJ	Bénin	GR	Grèce	NO	Norvège
BR	Brésil	HU	Hongrie	PL	Pologne
CA	Canada	IT	Italie	RO	Roumanie
CF	République Centrafricaine	JP	Japon	SD	Soudan
CG	Congo	KP	République populaire démocratique de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KR	République de Corée	SN	Sénégal
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SU ⁺	Union soviétique
CM	Cameroon	LK	Sri Lanka	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TG	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	US	Etats-Unis d'Amérique
DK	Danemark				

+ Toute désignation de "SU" produit ses effets dans la Fédération de Russie. On ignore encore si une telle désignation produit ses effets dans les autres Etats de l'ancienne Union soviétique.

Anticorps monoclonal utile pour le diagnostic de la
maladie d'Alzheimer, hybridome sécréteur d'un tel
anticorps monoclonal et procédé pour sa préparation.

L'invention concerne un anticorps monoclonal dirigé contre une partie du domaine extracellulaire du précurseur du peptide amyloïde, et son utilisation pour le diagnostic de la maladie d'Alzheimer.

5 L'invention concerne également l'hybridome capable de produire un tel anticorps, un procédé pour la préparation de cet hybridome, ainsi que la protéine antigène utilisée dans ce procédé.

10 La maladie d'Alzheimer est responsable de plus de la moitié des cas de démence sénile. Selon certaines statistiques, on estime actuellement que 10 à 15% de la population âgée de plus de 65 ans et 20 à 40% de la population âgée de plus de 80 ans sont atteints de la maladie d'Alzheimer.

15 Les symptômes de la maladie d'Alzheimer sont des troubles de la mémoire et une diminution progressive des capacités intellectuelles.

La maladie d'Alzheimer est caractérisée par la perte de neurones et la présence de lésions cérébrales. Ces
20 lésions consistent d'une part en des dépôts extracellulaires de substance amyloïde présents sous forme de plaques séniles et de dépôts cérébro-vasculaires. D'autre part, il existe des altérations neurofibrillaires qui conduisent à la formation de lésions intraneuronales.

25 De nombreux travaux ont été réalisés pour mieux comprendre le mécanisme de formation des lésions caractéristiques de la maladie d'Alzheimer.

A partir des plaques séniles, un peptide de 42 acides aminés a été isolé et appelé peptide A4 [C.L. Masters
30 & Al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:4245-4249 (1985)].

A partir des dépôts cérébrovasculaires, un petit peptide très proche du peptide A4 a été isolé et appelé

peptide β [G. Glenner & Al., Bioch. Bioph. Res. Com. 120:885-890 (1984)]. Actuellement, on préfère regrouper ces deux appellations sous le terme ABP (Amyloid β Peptide).

A l'aide d'une sonde moléculaire (sonde ADN_c),
5 les ARN messagers correspondant au précurseur du peptide ABP ont été découverts et séquencés.

Le précurseur du peptide ABP une glycoprotéine transmembranaire, est appelé APP (Amyloid Peptide Precursor). Jusqu'à présent 4 versions différentes de ce
10 précurseur ont été découvertes. Elles comprennent respectivement 695 acides aminés [J. Kang & Al., Nature 325, 733-736 (1987)], 751 acides aminés [P. Ponte & Al., Nature 331, 525-527 (1988); R. Tanzi & Al., Nature 331, 528-530 (1988)], 770 acides aminés [N. Kitaguchi & Al., Nature 331,
15 530-532 (1988)] et 563 acides aminés [F. de Sauvage & Al., Science 245, 651-653 (1989)]. Le précurseur de 770 acides aminés comprend une séquence spécifique de 55 acides aminés décrite dans la demande de brevet n° EP-A-0304013.

Pour faciliter la compréhension de la suite de
20 l'exposé, la séquence complète du précurseur de 770 acides aminés, appelé APP 770, est donnée à la Fig. 1, dans le sens amino-carboxy.

Le gène correspondant aux quatre précurseurs du peptide ABP est situé sur le chromosome 21.

25 Le précurseur APP est aussi présent sous forme soluble dans le liquide céphalo-rachidien d'individus normaux et de patients atteints de la maladie d'Alzheimer. Cette protéine soluble comprend le domaine extra-cellulaire du précurseur (fragment N-terminal) et a perdu le domaine
30 transmembranaire et le domaine cytoplasmique (fragment C-terminal).

En effet des anticorps dirigés contre le précurseur APP 695 ont reconnu la forme soluble de l'APP alors que des anticorps dirigés contre le domaine
35 cytoplasmique (fragment C-terminal de 43 acides aminés) n'ont pas reconnu la forme soluble de l'APP [Weideman & Al.,

Cell. 57, 115-126 (1989)].

Les altérations neurofibrillaires, situées à l'intérieur des neurones se composent de filaments hélicoïdaux appariés deux à deux de manière caractéristique.

5 En réalité le diagnostic n'est pas facile à établir, d'abord parce qu'il existe des affections qui ressemblent à la maladie d'Alzheimer (démences vasculaires, syndromes dépressifs du sujet âgé), ensuite parce qu'il n'existe pas encore de test diagnostique spécifique qui soit
10 ante-mortem.

Jusqu'à présent, différentes voies de diagnostic sont ouvertes :

l'étude des fonctions intellectuelles supérieures mettant en oeuvre des techniques de neuropsychologie,
15 représente une première approche diagnostique.

Le scanner cérébral permet de visualiser l'atrophie du cortex cérébral et d'éliminer certaines autres affections, en particulier des affections curables.

La Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) en tant
20 que nouvelle technique d'imagerie permet une meilleure visualisation des petites lésions cérébrales vasculaires et peut améliorer le diagnostic différentiel entre démence vasculaire et maladie d'Alzheimer. Ces deux dernières techniques réalisent en fait un diagnostic d'exclusion.

25 La caméra à positrons permet l'étude du métabolisme du cerveau en analysant la consommation cérébrale en glucose. Différentes recherches ont montré qu'au cours de la maladie d'Alzheimer, la consommation en glucose est réduite, et ont pu localiser les zones
30 préférentiellement atteintes. Bien qu'apportant de précieuses informations, cette technique ne constitue pas encore un moyen de diagnostic réel.

Actuellement, le seul diagnostic sûr est l'analyse microscopique, post-mortem, du tissu cérébral,
35 mettant en évidence la présence de dépôts de substance amyloïde.

Des recherches antérieures ont montré que les altérations neurofibrillaires étaient reconnues par des anticorps préparés contre certaines protéines cérébrales normales, telles que la protéine MAP2 [K. Kosik & Al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 7941-7945 (1984)] ou la protéine Tau [J.P. Brion & Al., Arch. Biol. (Brux.), 95, 229-235 (1985); K. Kosik & Al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 4044-4048 (1986); A. Delacourte & Al., J. Neurol. Sci., 76, 173-186 (1986)].

Par contre ces altérations neurofibrillaires intracellulaires n'ont jusqu'ici jamais été reconnues par des anticorps préparés contre le précurseur APP. Ceux-ci n'ont réussi qu'à reconnaître les neurites dégénérés qui entourent le dépôt amyloïde des plaques séniles.

La présente invention a pour but de préparer un anticorps monoclonal qui permette tant le diagnostic post-mortem de la maladie d'Alzheimer, en mettant en évidence à la fois les altérations neurofibrillaires et les plaques séniles, que le diagnostic ante-mortem (dosage de la forme soluble de l'APP dans le liquide céphalo-rachidien et détection des lésions caractéristiques de la maladie dans les tissus périphériques, en particulier dans la muqueuse olfactive).

La présente invention a pour objet un anticorps monoclonal dirigé contre une séquence d'acides aminés comprise dans la partie extracellulaire du précurseur APP. Cette séquence est commune au précurseur transmembranaire ainsi qu'à sa forme sécrétée soluble. Dans le cas du précurseur 770, la partie extracellulaire s'étend des acides aminés situés aux positions 1 à 699, la partie transmembranaire s'étend des acides aminés situés aux positions 700 à 723 et la partie cytoplasmique s'étend des acides aminés situés aux positions 724 à 770 de la Fig. 1.

L'anticorps monoclonal suivant l'invention est capable de reconnaître les deux types de lésions caractéristiques de la maladie d'Alzheimer (plaques séniles

et altérations neurofibrillaires) ainsi que la forme soluble du précurseur APP présente dans le sérum et le liquide céphalo-rachidien.

Préférentiellement, ladite séquence est délimitée par les acides aminés situés aux positions 81 à 481 de la Fig. 1. Ces acides aminés correspondent aux acides aminés 81 à 406 du précurseur APP 695 dont la séquence complète a été publiée par J. Kang et al. [Nature 325, page 734 (1987)].

Dans une forme préférée de l'invention, l'anticorps monoclonal est dirigé contre une protéine de fusion entre ladite séquence d'acides aminés et la β -galactosidase. Cette protéine est obtenue par expression du fragment d'ADN_c correspondant, par des cellules d'E. Coli transformées par le vecteur d'expression Puex I. Le dit fragment d'ADN_c est inséré dans le site Pst 1 de ce vecteur.

La synthèse de la β -galactosidase, est contrôlée par un promoteur bactérien puissant qui permet l'expression en grande quantité, de ladite protéine de fusion.

La protéine de fusion, ainsi obtenue, constitue un antigène exempt de toute contamination par d'autres protéines cérébrales qui pourraient être contenues, par exemple, dans les altérations neurofibrillaires.

En particulier, l'anticorps monoclonal suivant l'invention fait partie de la classe des IgM et est produit par l'hybridome déposé à l'ECACC le 20 novembre 1990 sous le numéro d'accès 90112001.

En particulier, l'anticorps monoclonal reconnaît un épitope compris dans la séquence délimitée par les acides aminés 261 à 284 de la Fig. 1.

La présente invention a également pour objet l'utilisation de l'anticorps monoclonal sus-décrit pour la détection immunologique des altérations neurofibrillaires et des plaques séniles. Ce test immunologique peut notamment être réalisé sur des biopsies de muqueuses olfactives ainsi que sur des échantillons de tissus cérébraux prélevés,

post-mortem, chez des sujets atteints de la maladie d'Alzheimer.

De plus, la présente invention a pour objet l'utilisation de ce même anticorps pour le dosage de la
5 forme soluble du précurseur APP présente dans le sérum et le liquide céphalo-rachidien de patients atteints de la maladie d'Alzheimer.

La présente invention a également pour objet l'hybridome produisant l'anticorps monoclonal suivant
10 l'invention, déposé à l'ECACC le 20 novembre 1990 sous le numéro d'accès 90112001.

L'invention a également pour objet un procédé pour la préparation de l'hybridome suivant lequel on immunise un animal, avec une protéine comportant une
15 séquence d'acides aminés comprise dans la partie extracellulaire du précurseur APP, on réalise une fusion entre les cellules spléniques de cet animal et les cellules myélomateuses appropriées en mettant en oeuvre une technique en soi connue (Milstein et Kohler, Nature 256 (1975)), on
20 clone les cellules hybrides résultantes et on sélectionne les clones cellulaires qui produisent l'anticorps monoclonal désiré.

Dans une forme préférée de l'invention, ladite séquence est délimitée par les acides aminés situés aux
25 positions 81 à 481 du précurseur APP 770, tel que séquencé à la Fig. 1.

Suivant une forme de réalisation avantageuse, la protéine utilisée pour immuniser l'animal est une protéine de fusion obtenue par expression de cellules bactériennes.

30 Avantageusement, lesdites cellules sont des cellules d'E. coli transformées par un plasmide résultant, de préférence, de l'insertion dans le site Pst 1 du vecteur Puex I, d'une séquence d'acides aminés comprise dans la partie extracellulaire du précurseur APP. Cette séquence
35 est, de préférence, délimitée par les acides aminés 81 à 481 du précurseur APP 770 de la Fig. 1.

Des caractéristiques supplémentaires de l'invention apparaîtront encore au cours de la description détaillée d'un exemple de fabrication de l'hybridome sécréteur de l'anticorps monoclonal défini ci-dessus.

5 1. Préparation de l'antigène

Pour éviter toute contamination de l'antigène par d'autres protéines, la protéine antigénique n'a pas été isolée de tissus pathologiques mais a été préparée par expression génétique, après transformation de cellules
10 bactériennes par un plasmide adéquat.

1.1 Préparation du plasmide.

Le fragment de restriction Pst 1 codant pour la séquence en acides aminés 81 à 481 du précurseur APP 770 a été inséré dans le site Pst 1 du vecteur d'expression
15 Puex I. Le plasmide résultant codait pour une protéine de fusion consistant en la β -galactosidase suivie de la séquence extracellulaire du précurseur APP (séquence 81 à 481 de la Fig. 1).

1.2. Expression de la protéine de fusion.

20 Des cellules d'E. Coli ont été transformées par ce plasmide et cultivées pendant 2 h à 42°C. Cette température élevée est nécessaire pour induire l'expression car le plasmide contient le répresseur thermosensible CI 857.

25 1.3. Extraction et purification de la protéine de fusion.

Les cellules d'E. Coli ont été collectées par centrifugation à 2000 g pendant 15 minutes. Le culot a été remis en suspension dans 20 ml de tampon contenant du Tris-HCl 50 mM de pH8, de l'EDTA 1 mM, du NaCl 50 mM, du
30 fluorure de phénylméthylsulfonyl 1 mM et 8 mg de lysozyme. Après 20 minutes d'incubation de la suspension sur de la glace, 4 ml d'acide désoxycholique à 1% ont été ajoutés. La solution a été incubée à 37°C pour arriver à une viscosité élevée.

35 L'ADN bactérien a été digéré par addition de 200 μ l d'ADNase à une concentration de 1 mg/ml et de $MgCl_2$

jusqu'à atteindre une concentration finale de 10 mM.

Après 15 minutes d'incubation à température ambiante, les corps d'inclusion ont été recueillis par centrifugation à 5000 g pendant 5 minutes, puis lavés trois
5 fois dans le tampon précédemment décrit additionné de 0,5% de Triton X-100.

Après électrophorèse préparatoire sur gel d'acrylamide et coloration du gel avec du bleu Coomassie à 0,1%, la bande correspondant à la protéine de fusion a été
10 excisée. Ce fragment de gel excisé a été homogénéisé dans un volume de solution physiologique salée, tamponnée au phosphate. L'homogénat a été incubé jusqu'au lendemain pour permettre la diffusion de la protéine, et centrifugé à 12.000 g pendant 5 minutes.

15 La protéine de fusion est alors recueillie dans le surnageant.

2. Immunisation.

50 µg de la protéine de fusion diluée dans de l'adjuvant complet de Freund ont été injectés par voie
20 intrapéritonéale à des souris Balb/C aux jours 0, 7, 18, 28 et 35. 42 jours après la dernière inoculation, une réponse immunitaire a été observée dans le sérum des souris.

3. Préparation des hybridomes.

Des cellules spléniques des souris immunisées ont
25 été isolées dans 10 ml du milieu de culture DMEM de Gibco additionné de 100 U/ml de pénicilline et de 100 U/ml de streptomycine.

La solution est centrifugée à 1200 g pendant 10 minutes et le culot est lavé 2 fois avec ce même milieu de
30 culture. Les cellules spléniques ainsi récoltées, ont été colorées au bleu trypan et comptées dans une cellule de Burker.

Les cellules spléniques et des cellules de myélome (NSO) ont été mélangées dans un rapport 5/1. Le
35 mélange de cellules a été centrifugé à 2500 g pendant 5 minutes et incubé en présence de 1 ml de polyéthylène glycol

1500 (PEG) à une concentration de 0,5 g/1500 ml de tampon HEPES 75 mM.

Après dilution progressive dans le milieu de culture DMEM précédemment décrit, les cellules ont été
5 recueillies par centrifugation à 1200 g pendant 10 minutes puis remises en suspension dans le milieu de sélection HAT de Gibco. Ce milieu ne permet la croissance que des cellules hybrides.

La suspension a été répartie dans des plaques à
10 96 cupules à raison de 200 µl de suspension par cupule. Les cellules ont été maintenues en culture sous une atmosphère humidifiée contenant 5% de CO₂.

Après 10 jours de culture les surnageants des cupules contenaient des colonies hybrides suffisamment
15 développées.

4. Sélection de l'hybridome produisant l'anticorps monoclonal désiré.

Les surnageants de culture des cellules hybrides ont été testés pour la production de l'anticorps monoclonal
20 désiré par réaction immunoenzymatique (ELISA).

L'antigène de référence (dont la préparation est décrite au point 1) à une concentration de 0,5 µg/ml dans un tampon contenant de la glycine 50 mM de pH 9,2 a été fixé sur un support solide (par exemple une plaque de
25 microtitrage).

L'antigène a ensuite été mis à incuber à 37°C pendant 2 h avec 50 µl du surnageant des cultures d'hybridomes.

L'anticorps monoclonal capable de reconnaître
30 l'antigène de référence est retenu par l'antigène fixé et sa présence a été détectée à l'aide d'un anti-sérum de lapin anti IgG de souris, cet anti-sérum étant mis en évidence par la protéine A marquée à la peroxydase.

Pour cela, après incubation des cupules avec le
35 surnageant, celles-ci sont mises à incuber à température ambiante pendant 1 h avec 50 µl de l'anti-sérum puis avec

la protéine A. Après chaque incubation les plaques sont lavées 5 fois avec une solution de NaCl 0,25 mM contenant 0,2% de Tween 20.

5 L'activité enzymatique de la peroxydase a été développée au moyen de 0,04% d'ortho-phénylènediamine dans de l' H_2O_2 à 0,006% puis arrêtée par addition de 25 μ l par cupule d' H_2SO_4 4M.

La lecture de l'absorbance à 425 et 620 nm a permis de localiser l'hybridome producteur de l'anticorps monoclonal reconnu par l'antigène de référence.

10 5. Production de l'anticorps monoclonal désiré.

L'anticorps monoclonal désiré est produit par injection intrapéritonéale à des souris, de l'hybridome adéquat (sélectionné au point 4).

15 Le liquide d'ascite prélevé de ces souris contient l'anticorps monoclonal désiré à une concentration élevée.

6. Caractérisation de l'anticorps monoclonal.

La technique d'immunotransfert a permis d'étudier la spécificité de l'anticorps monoclonal, premièrement, par rapport à un antigène obtenu par expression génétique et deuxièmement par rapport à l'antigène isolé des tissus cérébraux.

20 6.1. Caractérisation de l'anticorps monoclonal par rapport à un antigène obtenu par expression génétique.

25 Des cellules COS (lignée de cellules rénales de singe) ont été transfectées par le vecteur de transfection pPCR 3 dans lequel le fragment d'ADN_c codant pour le précurseur APP 770 avait été préalablement introduit. Les cellules COS ont été choisies pour leur capacité à exprimer une protéine glycosilée c'est à dire très proche des protéines natives.

Ces cellules COS ont été mises en culture dans du milieu DMEM de Gibco contenant 5% de sérum de veau foetal, puis incubées pendant 24 h dans un milieu de culture sans sérum.

Ces cellules, ainsi que leur milieu de culture ont alors été analysées conjointement par la technique d'immunotransfert.

En résumé, les cellules à analyser ont été lysées dans un tampon réducteur contenant du SDS. D'autre part les protéines provenant du milieu de culture sans sérum ont été désalées par chromatographie sur une colonne de séphadex G25, puis concentrées par lyophilisation et enfin solubilisées dans le même tampon que les cellules COS.

Les protéines associées aux cellules COS et les protéines provenant du milieu de culture ont alors été soumises à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes.

Les protéines ont été transférées du gel sur une membrane de nitrocellulose à l'aide d'un appareil de transfert semi-sec fourni par Biométra.

Pour éviter la fixation non spécifique des protéines, la membrane a été incubée dans une solution contenant 5% de lait écrémé avant d'être incubée une nuit avec le fluide d'ascite, dilué à 1/1000, contenant l'anticorps monoclonal obtenu au point 5.

La réaction antigène-anticorps est décelée par incubation de la membrane avec un deuxième anticorps anti-souris biotinylé produit chez la chèvre puis avec le complexe streptodivine-phosphatase alcaline.

Pour l'analyse des protéines associées aux cellules COS transfectées et l'analyse des protéines provenant du milieu de culture, on obtient dans le gel des bandes majeures correspondant à des protéines d'environ 130 kDa. Ces différentes bandes correspondent aux précurseurs APP.

L'analyse des cellules COS non transfectées montre de faibles bandes dans le gel, correspondant à un faible niveau d'expression endogène de la protéine APP par les cellules COS.

Les résultats de cette analyse montrent donc que

l'anticorps monoclonal suivant l'invention a reconnu spécifiquement la protéine APP exprimée par des cellules COS transfectées par le fragment d'ADN_c codant pour l'APP 770.

6.2. Caractérisation de l'anticorps monoclonal par rapport

5 à un antigène contenu dans des tissus cérébraux.

Du tissu cérébral prélevé chez le rat et l'homme a été analysé par la technique d'immunotransfert à l'aide de l'anticorps monoclonal suivant l'invention.

10 Du cerveau total de rat et des échantillons de cortex frontal humain ont été homogénéisés (1 g/ml) dans du tampon MES 0,1 M de pH 6,8 contenant de l'EDTA 1 mM, de la leupeptine (25 µg/ml), de l'inhibiteur de trypsine (100 µg/ml) et du fluorure de phénylméthylsulfonyl (0,5 mM).

15 Les homogénats ont été centrifugés à 90.000 g pendant 60 minutes à 4°C et le surnageant a été retenu pour les expériences d'immunotransfert.

Les protéines du surnageant ont été analysées par immunotransfert de la même manière que les cellules COS (voir point 6.1).

20 Les résultats de l'analyse montrent des bandes à des PM situés entre 100 et 135 kDa. Ces bandes représentent les différentes versions du précurseur APP qui ont été reconnues par l'anticorps monoclonal suivant l'invention.

Des bandes à des PM inférieurs ont également été 25 décelées par l'anticorps.

6.3. Caractérisation de l'épitope reconnu par l'anticorps.

Le fragment de restriction Pst I codant pour la séquence en acides aminés 81 à 481 du précurseur APP 770 (Fig. 1), initialement utilisé pour produire l'antigène, a 30 été divisé en sept fragments différents qui ont été amplifiés par la réaction en chaîne de la polymérase décrite par Saiki en 1988 (Saiki R.K. et al., Science 239, 487-491, 1988). Ces différents fragments ont été clonés dans le vecteur d'expression bactérien pUEX II, et les protéines 35 correspondantes, exprimées sous forme de protéines de fusion avec la β-galactosidase, ont été analysées après

électrophorèse sur gel de polyacrylamide, transfert sur membrane de nitrocellulose, et immunodétection à l'aide de l'anticorps suivant l'invention. La reconnaissance de certains fragments protéiques a permis de définir l'épitope de l'anticorps, au sein d'une séquence de 24 acides aminés délimitée par les acides aminés 261 à 284 de la Fig. 1 (Cette séquence est soulignée à la Fig. 1).

7. Utilisation de l'anticorps monoclonal comme outil de diagnostic de la maladie d'Alzheimer.

10 L'anticorps monoclonal suivant l'invention a été utilisé pour l'analyse immunohistochimique de coupes de cerveau humain normal et de cerveau de patients atteints de la maladie d'Alzheimer. L'analyse a été réalisée suivant le procédé peroxydase-antiperoxydase.

15 Les échantillons de tissus de cerveau provenant de la région de l'hippocampe et du cortex temporal ont été prélevés, post-mortem, fixés dans le formol à 10% et enrobés de paraffine. Des coupes d'une épaisseur de 10 μ m ont été réalisées.

20 Après élimination de la paraffine et réhydratation des coupes, l'activité de la peroxydase endogène a été bloquée par incubation pendant 30 minutes dans une solution d' H_2O_2 dans du méthanol à 70%. Les coupes de tissu ont été ensuite incubées pendant 1 h dans du sérum de chèvre normal dilué 10 fois dans une solution physiologique salée tamponnée au Tris 0,05 M (TBS) (pH 7,4).

25 Les coupes ont alors été incubées pendant 16 h à température ambiante avec le fluide d'ascite contenant l'anticorps monoclonal suivant l'invention, dilué à 1/250° dans du TBS contenant 1,3 g/l d'azoture de sodium et 10% de sérum de chèvre normal. Les coupes préalablement lavées dans du TBS sont alors incubées successivement pendant 30 minutes avec des anticorps anti-souris produit chez la chèvre, puis pendant 30 minutes avec le complexe peroxydase-
35 antiperoxydase.

La diaminobenzidine à 0,03% dans du Tris HCl 0,05

pH 7,6 avec 0,015% d' H_2O_2 permet de révéler la réaction de l'anticorps suivant l'invention avec l'antigène contenu dans les tissus cérébraux analysés.

Les résultats ne montrent aucune coloration des
5 coupes de cerveau humain normal par l'anticorps suivant l'invention alors que celui-ci colore tant les altérations neurofibrillaires que les plaques séniles trouvées dans les tissus cérébraux pathologiques.

Le marquage des altérations neurofibrillaires a
10 été confirmé par l'observation au microscope électronique de coupes de tissus incubées avec l'anticorps monoclonal suivant l'invention.

R E V E N D I C A T I O N S

- 1.- Anticorps monoclonal dirigé contre une séquence d'acides aminés comprise dans la partie
5 extracellulaire du précurseur APP, capable de mettre en évidence les deux types de lésions caractéristiques de la maladie d'Alzheimer et la forme soluble du précurseur APP.
- 2.- Anticorps monoclonal suivant la revendication 1, caractérisé en ce que ladite séquence est
10 délimitée par les acides aminés situés aux positions 81 à 481 de la Fig. 1.
- 3.- Anticorps monoclonal suivant l'une quelconque des revendications précédentes, produit par l'hybridome déposé à l'ECACC sous le numéro d'accès 90112001.
- 15 4.- Anticorps monoclonal suivant l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il reconnaît un épitope compris dans la séquence d'acides aminés délimitée par les acides aminés 261 à 284 de la Fig. 1.
- 20 5.- Utilisation de l'anticorps monoclonal suivant l'une quelconque des revendications précédentes, pour la détection immunologique des altérations neurofibrillaires et des plaques séniles caractéristiques de la maladie d'Alzheimer.
- 25 6.- Utilisation suivant la revendication 5, caractérisée en ce que ladite détection est réalisée, ante-mortem, sur des prélèvements de la muqueuse olfactive.
- 7.- Utilisation suivant la revendication 5, caractérisée en ce que ladite détection est réalisée,
30 post-mortem, sur des échantillons de tissus cérébraux.
- 8.- Utilisation de l'anticorps monoclonal suivant l'une quelconque des revendications 1 à 4 pour le dosage de la forme soluble du précurseur APP présente dans le sérum et le liquide céphalo-rachidien de patients atteints de la
35 maladie d'Alzheimer.
- 9.- Hybridome produisant un anticorps monoclonal

suivant l'une quelconque des revendications 1 à 4.

10.- Hybridome suivant la revendication 9, déposé à l'ECACC sous le numéro d'accès n° 90112001.

11.- Procédé pour la préparation de l'hybridome
5 suivant l'une quelconque des revendications 9 et 10, caractérisé en ce que :

1°) on immunise un animal avec une protéine comportant une séquence d'acides aminés comprise dans la partie extracellulaire du précurseur APP;

10 2°) suivant une méthode connue, on réalise une fusion entre les cellules spléniques de cet animal et des cellules myélomateuses appropriées, on clone les cellules résultant de ladite fusion et on sélectionne les clones cellulaires qui s'avèrent produire les anticorps monoclonaux
15 désirés.

12.- Procédé suivant la revendication 12, caractérisé en ce que ladite séquence est délimitée par les acides aminés 81 à 481 de la Fig. 1.

13.- Procédé suivant l'une quelconque des
20 revendications 11 et 12, caractérisé en ce que ladite protéine est une protéine de fusion obtenue par expression de cellules bactériennes.

14.- Procédé suivant la revendication 13, caractérisé en ce que lesdites cellules sont des cellules
25 d'E. coli transformées par un plasmide.

15.- Procédé suivant la revendication 14, caractérisé en ce que ledit plasmide résulte de l'insertion dans le site Pst 1 du vecteur Puex I, d'une séquence d'acides aminés comprise dans la partie extracellulaire du
30 précurseur APP.

16.- Procédé suivant la revendication 15, caractérisé en ce que ladite séquence est délimitée par les acides aminés 81 à 481 de la Fig. 1.

17.- Protéine utilisée dans le procédé suivant
35 l'une quelconque des revendications 11 à 16, pour immuniser l'animal.

1	Met	Leu	Pro	Gly	5	Leu	Ala	Leu	Leu	Leu	10	Leu	Ala	Ala	Trp	Thr	15	Ala	Arg
	ATG	CTG	CCC	GGT		TTG	GCA	CTG	CTC	CTG		CTG	GCC	GCC	TGG	ACG		GCT	CGG
				20						25							30		
	Ala	Leu	Glu	Val	Pro	Thr	Asp	Gly	Asn	Ala	Gly	Leu	Leu	Ala	Glu	Pro			
	GCG	CTG	GAG	GTA	CCC	ACT	GAT	GGT	AAT	GCT	GGC	CTG	CTG	GCT	GAA	CCC			
				35					40					45					
	Gln	Ile	Ala	Met	Phe	Cys	Gly	Arg	Leu	Asn	Met	His	Met	Asn	Val	Gln			
	CAG	ATT	GCC	ATG	TTC	TGT	GGC	AGA	CTG	AAC	ATG	CAC	ATG	AAT	GTC	CAG			
				50				55				60							
	Asn	Gly	Lys	Trp	Asp	Ser	Asp	Pro	Ser	Gly	Thr	Lys	Thr	Cys	Ile	Asp			
	AAT	GGG	AAG	TGG	GAT	TCA	GAT	CCA	TCA	GGG	ACC	AAA	ACC	TGC	ATT	GAT			
				65			70			75						80			
	Thr	Lys	Glu	Gly	Ile	Leu	Gln	Tyr	Cys	Gln	Glu	Val	Tyr	Pro	Glu	Leu			
	ACC	AAG	GAA	GGC	ATC	CTG	CAG	TAT	TGC	CAA	GAA	GTC	TAC	CCT	GAA	CTG			
					85				90					95					
	Gln	Ile	Thr	Asn	Val	Val	Glu	Ala	Asn	Gln	Pro	Val	Thr	Ile	Gln	Asn			
	CAG	ATC	ACC	AAT	GTG	GTA	GAA	GCC	AAC	CAA	CCA	GTG	ACC	ATC	CAG	AAC			
				100					105					110					
	Trp	Cys	Lys	Arg	Gly	Arg	Lys	Gln	Cys	Lys	Thr	His	Pro	His	Phe	Val			
	TGG	TGC	AAG	CGG	GGC	CGC	AAG	CAG	TGC	AAG	ACC	CAT	CCC	CAC	TTT	GTG			
				115				120				125							
	Ile	Pro	Tyr	Arg	Cys	Leu	Val	Gly	Glu	Phe	Val	Ser	Asp	Ala	Leu	Leu			
	ATT	CCC	TAC	CGC	TGC	TTA	GTT	GGT	GAG	TTT	GTA	AGT	GAT	GCC	CTT	CTC			
				130				135				140							
	Val	Pro	Asp	Lys	Cys	Lys	Phe	Leu	His	Gln	Glu	Arg	Met	Asp	Val	Cys			
	GTT	CCT	GAC	AAG	TGC	AAA	TTC	TTA	CAC	CAG	GAG	AGG	ATG	GAT	GTT	TGC			
				145			150			155				160					
	Glu	Thr	His	Leu	His	Trp	His	Thr	Val	Ala	Lys	Glu	Thr	Cys	Ser	Glu			
	GAA	ACT	CAT	CTT	CAC	TGG	CAC	ACC	GTC	GCC	AAA	GAG	ACA	TGC	AGT	GAG			
					165				170					175					
	Lys	Ser	Thr	Asn	Leu	His	Asp	Tyr	Gly	Met	Leu	Leu	Pro	Cys	Gly	Ile			
	AAG	AGT	ACC	AAC	TTG	CAT	GAC	TAC	GGC	ATG	TTG	CTG	CCC	TGC	GGA	ATT			
				180				185					190						
	Asp	Lys	Phe	Arg	Gly	Val	Glu	Phe	Val	Cys	Cys	Pro	Leu	Ala	Glu	Glu			
	GAC	AAG	TTC	CGA	GGG	GTA	GAG	TTT	GTG	TGT	TGC	CCA	CTG	GCT	GAA	GAA			

FIG. 1

2/4

195				200				205							
Ser	Asp	Asn	Val	Asp	Ser	Ala	Asp	Ala	Glu	Glu	Asp	Asp	Ser	Asp	Val
AGT	GAC	AAT	GTG	GAT	TCT	GCT	GAT	GCG	GAG	GAG	GAT	GAC	TCG	GAT	GTC
210				215				220							
Trp	Trp	Gly	Gly	Ala	Asp	Thr	Asp	Tyr	Ala	Asp	Gly	Ser	Glu	Asp	Lys
TGG	TGG	GGC	GGA	GCA	GAC	ACA	GAC	TAT	GCA	GAT	GGG	AGT	GAA	GAC	AAA
225				230				235				240			
Val	Val	Glu	Val	Ala	Glu	Glu	Glu	Glu	Val	Ala	Glu	Val	Glu	Glu	Glu
GTA	GTA	GAA	GTA	GCA	GAG	GAG	GAA	GAA	GTG	GCT	GAG	GTG	GAA	GAA	GAA
245				250				255							
Glu	Ala	Asp	Asp	Asp	Glu	Asp	Asp	Glu	Asp	Gly	Asp	Glu	Val	Glu	Glu
GAA	GCC	GAT	GAT	GAC	GAG	GAC	GAT	GAG	GAT	GGT	GAT	GAG	GTA	GAG	GAA
260				265				270							
Glu	Ala	Glu	Glu	Pro	Tyr	Glu	Glu	Ala	Thr	Glu	Arg	Thr	Thr	Ser	Ile
GAG	GCT	GAG	GAA	CCC	TAC	GAA	GAA	GCC	ACA	GAG	AGA	ACC	ACC	AGC	ATT
275				280				285							
Ala	Thr	Thr	Thr	Thr	Thr	Thr	Thr	Glu	Ser	Val	Glu	Glu	Val	Val	Arg
GCC	ACC	ACC	ACC	ACC	ACC	ACC	ACA	GAG	TCT	GTG	GAA	GAG	GTG	GTT	CGA
290				295				300							
Glu	Val	Cys	Ser	Glu	Gln	Ala	Glu	Thr	Gly	Pro	Cys	Arg	Ala	Met	Ile
GAG	GTG	TGC	TCT	GAA	CAA	GCC	GAG	ACG	GGG	CCG	TGC	CGA	GCA	ATG	ATC
305				310				315				320			
Ser	Arg	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val	Thr	Glu	Gly	Lys	Cys	Ala	Pro	Phe	Phe
TCC	CGC	TGG	TAC	TTT	GAT	GTG	ACT	GAA	GGG	AAG	TGT	GCC	CCA	TTC	TTT
325				330				335							
Tyr	Gly	Gly	Cys	Gly	Gly	Asn	Arg	Asn	Asn	Phe	Asp	Thr	Glu	Glu	Tyr
TAC	GGC	GGA	TGT	GGC	GGC	AAC	CGG	AAC	AAC	TTT	GAC	ACA	GAA	GAG	TAC
340				345				350							
Cys	Met	Ala	Val	Cys	Gly	Ser	Ala	Met	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	Lys	Thr
TGC	ATG	GCC	GTG	TGT	GGC	AGC	GCC	ATG	TCC	CAA	AGT	TTA	CTC	AAG	ACT
355				360				365							
Thr	Gln	Glu	Pro	Leu	Ala	Arg	Asp	Pro	Val	Lys	Leu	Pro	Thr	Thr	Ala
ACC	CAG	GAA	CCT	CTT	GGC	CGA	GAT	CCT	GTT	AAA	CTT	CCT	ACA	ACA	GCA
370				375				380							
Ala	Ser	Thr	Pro	Asp	Ala	Val	Asp	Lys	Tyr	Leu	Glu	Thr	Pro	Gly	Asp
GCC	AGT	ACC	CCT	GAT	GCC	GTT	GAC	AAG	TAT	CTC	GAG	ACA	CCT	GGG	GAT

FIG.1 (suite)

3/4

385					390					395					400
Glu	Asn	Glu	His	Ala	His	Phe	Gln	Lys	Ala	Lys	Glu	Arg	Leu	Glu	Ala
GAG	AAT	GAA	CAT	GCC	CAT	TTC	CAG	AAA	GCC	AAA	GAG	AGG	CTT	GAG	GCC
					405					410					415
Lys	His	Arg	Glu	Arg	Met	Ser	Gln	Val	Met	Arg	Glu	Trp	Glu	Glu	Ala
AAG	CAC	CGA	GAG	AGA	ATG	TCC	CAG	GTC	ATG	AGA	GAA	TGG	GAA	GAG	GCA
					420					425					430
Glu	Arg	Gln	Ala	Lys	Asn	Leu	Pro	Lys	Ala	Asp	Lys	Lys	Ala	Val	Ile
GAA	CGT	CAA	GCA	AAG	AAC	TTG	CCT	AAA	GCT	GAT	AAG	AAG	GCA	GTT	ATC
					435					440					445
Gln	His	Phe	Gln	Glu	Lys	Val	Glu	Ser	Leu	Glu	gln	Glu	Ala	Ala	Asn
CAG	CAT	TTC	CAG	GAG	AAA	GTG	GAA	TCT	TTG	GAA	CAG	GAA	GCA	GCC	AAC
					450					455					460
Glu	Arg	Gln	Gln	Leu	Val	Glu	Thr	His	Met	Ala	Arg	Val	Glu	Ala	Met
GAG	AGA	CAG	CAG	CTG	GTG	GAG	ACA	CAC	ATG	GCC	AGA	GTG	GAA	GCC	ATG
465						470				475					480
Leu	Asn	Asp	Arg	Arg	Arg	Leu	Ala	Leu	Glu	Asn	Tyr	Ile	Thr	Ala	Leu
CTC	AAT	GAC	CGC	CGC	CGC	CTG	GCC	CTG	GAG	AAC	TAC	ATC	ACC	GCT	CTG
					485					490					495
Gln	Ala	Val	Pro	Pro	Arg	Pro	Arg	His	Val	Phe	Asn	Met	Leu	Lys	Lys
CAG	GCT	GTT	CCT	CCT	CGG	CCT	CGT	CAC	GTG	TTC	AAT	ATG	CTA	AAG	AAG
					500					505					510
Tyr	Val	Arg	Ala	Glu	Gln	Lys	Asp	Arg	Gln	His	Thr	Leu	Lys	His	Phe
TAT	GTC	CGC	GCA	GAA	CAG	AAG	GAC	AGA	CAG	CAC	ACC	CTA	AAG	CAT	TTC
					515					520					525
Glu	His	Val	Arg	Met	Val	Asp	Pro	Lys	Lys	Ala	Ala	Gln	Ile	Arg	Ser
GAG	CAT	GTG	CGC	ATG	GTG	GAT	CCC	AAG	AAA	GCC	GCT	CAG	ATC	CGG	TCC
					530					535					540
Gln	Val	Met	Thr	His	Leu	Arg	Val	Ile	Tyr	Glu	Arg	Met	Asn	Gln	Ser
CAG	GTT	ATG	ACA	CAC	CTC	CGT	GTG	ATT	TAT	GAG	CGC	ATG	AAT	CAG	TCT
					545					550					555
Leu	Ser	Leu	Leu	Tyr	Asn	Val	Pro	Ala	Val	Ala	Glu	Glu	Ile	Gln	Asp
CTC	TCC	CTG	CTC	TAC	AAC	GTG	CCT	GCA	GTG	GCC	GAG	GAG	ATT	CAG	GAT
					565					570					575
Glu	Val	Asp	Glu	Leu	Leu	Gln	Lys	Glu	Gln	Asn	Tyr	Ser	Asp	Asp	Val
GAA	GTT	GAT	GAG	CTG	CTT	CAG	AAA	GAG	CAA	AAC	TAT	TCA	GAT	GAC	GTC

FIG. 1 (suite)

4/4

										580					585					590									
Leu	Ala	Asn	Met	Ile	Ser	Glu	Pro	Arg	Ile	Ser	Tyr	Gly	Asn	Asp	Ala														
TTG	GCC	AAC	ATG	ATT	AGT	GAA	CCA	AGG	ATC	AGT	TAC	GGA	AAC	GAT	GCT														
										595					600					605									
Leu	Met	Pro	Ser	Leu	Thr	Glu	Thr	Lys	Thr	Thr	Val	Glu	Leu	Leu	Pro														
CTC	ATG	CCA	TCT	TTG	ACC	GAA	ACG	AAA	ACC	ACC	GTG	GAG	CTC	CTT	CCC														
										610					615					620									
Val	Asn	Gly	Glu	Phe	Ser	Leu	Asp	Asp	Leu	Gln	Pro	Trp	His	Ser	Phe														
GTG	AAT	GGA	GAG	TTC	AGC	CTG	GAC	GAT	CTC	CAG	CCG	TGG	CAT	TCT	TTT														
										625					630					635					640				
Gly	Ala	Asp	Ser	Val	Pro	Ala	Asn	Thr	Glu	Asn	Glu	Val	Glu	Pro	Val														
GGG	GCT	GAC	TCT	GTG	CCA	GCC	AAC	ACA	GAA	AAC	GAA	GTT	GAG	CCT	GTT														
										645					650					655									
Asp	Ala	Arg	Pro	Ala	Ala	Asp	Arg	Gly	Leu	Thr	Thr	Arg	Pro	Gly	Ser														
GAT	GCC	CGC	CCT	GCT	GCC	GAC	CGA	GGA	CTG	ACC	ACT	CGA	CCA	GGT	TCT														
										660					665					670									
Gly	Leu	Thr	Asn	Ile	Lys	Thr	Glu	Glu	Ile	Ser	Glu	Val	Lys	Met	Asp														
GGG	TTG	ACA	AAT	ATC	AAG	ACG	GAG	GAG	ATC	TCT	GAA	GTG	AAG	ATG	GAT														
										675					680					685									
Ala	Glu	Phe	Arg	His	Asp	Ser	Gly	Tyr	Glu	Val	His	His	Gln	Lys	Leu														
GCA	GAA	TTC	CGA	CAT	GAC	TCA	GGA	TAT	GAA	GTT	CAT	CAT	CAA	AAA	TTG														
										690					695					700									
Val	Phe	Phe	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Ser	Asn	Lys	Gly	Ala	Ile	Ile	Gly														
GTG	TTC	TTT	GCA	GAA	GAT	GTG	GGT	TCA	AAC	AAA	GGT	GCA	ATC	ATT	GGA														
										705					710					715					720				
Leu	Met	Val	Gly	Gly	Val	Val	Ile	Ala	Thr	Val	Ile	Val	Ile	Thr	Leu														
CTC	ATG	GTG	GGC	GGT	GTT	GTC	ATA	GCG	ACA	GTG	ATC	GTC	ATC	ACC	TTG														
										725					730					735									
Val	Met	Leu	Lys	Lys	Lys	Gln	Tyr	Thr	Sre	Ile	His	His	Gly	Val	Val														
GTG	ATG	CTG	AAG	AAG	AAA	CAG	TAC	ACA	TCC	ATT	CAT	CAT	GGT	GTG	GTG														
										740					745					750									
Glu	Val	Asp	Ala	Ala	Val	Thr	Pro	Glu	Glu	Arg	His	Leu	Ser	Lys	Met														
GAG	GTT	GAC	GCC	GCT	GTC	ACC	CCA	GAG	GAG	CGC	CAC	CTG	TCC	AAG	ATG														
										755					760					765									
Gln	Gln	Asn	Gly	Tyr	Glu	Asn	Pro	Thr	Tyr	Lys	Phe	Phe	Glu	Gln	Met														
CAG	CAG	AAC	GGC	TAC	GAA	AAT	CCA	ACC	TAC	AAG	TTC	TTT	GAG	CAG	ATG														
										770																			
Gln	Asn																												
CAG	AAC																												

FIG. 1 (suite)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/BE 91/00083

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (if several classification symbols apply, indicate all) ⁶		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC		
Int.Cl. ⁵ C12P 21/08, G01N 33/577 ; C07K 15/00; C12P 21/00		
II. FIELDS SEARCHED		
Minimum Documentation Searched ⁷		
Classification System	Classification Symbols	
Int.Cl. ⁵	C07K ; C12P	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the extent that such Documents are included in the Fields Searched ⁸		
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ⁹		
Category ¹⁰	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³
Y	EP, A, 0 304 013 (ASAHI KASEI KOGYO KABUSHIKI) 22 February 1989	1-17
Y	EP, A, 0 382 012 (COMMONWEALTH SCIENTIFIC AND INDUSTRIAL RESEARCH ORGANIZATION) 16 August 1990 see column 22, line 25 - column 23, line 27	1-17
A	WO, A, 8 906 242 (THE MCLEAN HOSPITAL CORP.) 13 July 1989	
A	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 12, No. 258 (C-513) 20 July 1988 & JP, A, 63 044 895 (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD) 25 February 1988 see abstract	

<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>¹⁰ Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"Δ" document member of the same patent family</p> </div> </div>		
IV. CERTIFICATION		
Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Mailing of this International Search Report	
25 February 1992 (25.02.92)	17 March 1992 (17.03.92)	
International Searching Authority	Signature of Authorized Officer	
EUROPEAN PATENT OFFICE		

ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO. BE 9100083
SA 53321

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report.
The members are as contained in the European Patent Office EDP file on
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information. 25/02/92

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-0304013	22-02-89	JP-A- 2138995	28-05-90
EP-A-0382012	16-08-90	None	
WO-A-8906242	13-07-89	AU-A- 3287989	01-08-89
		EP-A- 0440619	14-08-91

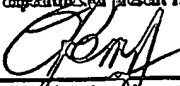
EP FORM P0079

For more details about this annex : see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/82

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/BE 91/00083

I. CLASSEMENT DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) ¹		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
CIB 5	C12P21/08; G01N3/577; C07K15/00;	C12P21/00
II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTÉ		
Documentation minimale consultée ⁸		
Système de classification	Symboles de classification	
CIB 5	C07K ; C12P	
Documentation consultée outre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté ⁹		
III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS ¹⁰		
Catégorie ¹¹	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire ¹² des passages pertinents ¹³	No. des revendications visées ¹⁴
Y	EP,A,0 304 013 (ASAHI KASEI KOGYO KABUSHIKI) 22 Février 1989 ----	1-17
Y	EP,A,0 382 012 (COMMONWEALTH SCIENTIFIC AND INDUSTRIAL RESEARCH ORGANIZATION) 16 Août 1990 voir colonne 22, ligne 25 - colonne 23, ligne 27 ----	1-17
A	WO,A,8 906 242 (THE MCLEAN HOSPITAL CORP.) 13 Juillet 1989 ----	
A	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 12, no. 258 (C-513) 20 Juillet 1988 & JP,A,63 044 895 (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD) 25 Février 1988 voir abrégé ----	
<p>¹¹ Catégories spéciales de documents cités:</p> <p>^A document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>^E document antérieur, mais publié à la date du dépôt international ou après cette date</p> <p>^L document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (elle qu'indiquée)</p> <p>^O document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une composition ou tous autres moyens</p> <p>^P document publié avant la date du dépôt international, mais postérieur à la date de priorité revendiquée</p> <p>^T document ultérieur publié postérieurement à la date du dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>^X document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive</p> <p>^Y document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.</p> <p>^Z document qui fait partie de la même famille de brevets</p>		
IV. CERTIFICATION		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
25 FEVRIER 1992		 17. 03. 92
Administration chargée de la recherche internationale		Signature du fonctionnaire autorisé
OFFICE EUROPEEN DES BREVETS		REMP G.L.E.

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE
RELATIF A LA DEMANDE INTERNATIONALE NO.**

BE 9100083
SA 53321

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche internationale visé ci-dessus.
Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 25/02/92.
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP-A-0304013	22-02-89	JP-A- 2138995	28-05-90
EP-A-0382012	16-08-90	Aucun	
WO-A-8906242	13-07-89	AU-A- 3287989	01-08-89
		EP-A- 0440619	14-08-91

EPO FORM P0071

Pour tout renseignement concernant cette annexe : voir Journal Officiel de l'Office européen des brevets, No.12/82